

Heat-processed fats : analysis of genotoxicity

Citation for published version (APA):

Hageman, G. J. (1990). *Heat-processed fats : analysis of genotoxicity*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19900622gh>

Document status and date:

Published: 01/01/1990

DOI:

[10.26481/dis.19900622gh](https://doi.org/10.26481/dis.19900622gh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The typical Western diet, characterized by its high fat and meat consumption, has repeatedly been reported to be associated with increased colon cancer incidence. Although several plausible mechanisms have been postulated, various epidemiologic as well as experimental studies have yielded conflicting evidence for a causal relation between high fat intake and tumorigenesis in the colon. This inconsistency may be due to the fact that in general epidemiological studies do not discriminate between heat-processed and unheated dietary lipids. In the introduction of this thesis it has been hypothesized that heat-processing of lipids may give rise to the formation of oxidation and degradation products, which may possess tumor-initiating or -enhancing activity. Heat-processing of lipids has not yet been implicated in experimental studies investigating the role of dietary fat in colon tumorigenesis. The aim of this thesis was therefore to determine genotoxic and other adverse biologic effects of heat-processed fats, in order to investigate their possible role in colon tumorigenesis. For this purpose, used deep-frying fats which is heated for prolonged periods of time, subject to oxidative deterioration during preparation of food, have been tested for genotoxicity as well as for biological activity in the colon.

In first instance, repeatedly used deep-frying fat samples, which were collected from local snack-bars and restaurants by officers of the Maastricht Office for Food Quality Control after sensory indication of abuse, were analyzed for mutagenicity to *Salmonella typhimurium*, in order to obtain an indication of possible tumor-initiating activity. Seventeen out of twenty samples tested were found to possess mutagenic activity to tester strains TA97, TA100 or TA104. Highest mutagenicity was detected in the polar fraction of these used deep-frying fat samples, which was isolated using silicagel column chromatography and reported to contain oxidation and heat degradation products. Mutagenicity exerted by these polar fractions was detected most sensitively by strain TA97, and was generally reduced when tested in presence of rat liver S9 mix. Numbers of revertants induced in this strain by repeatedly used deep-frying fat samples were estimated to range from $1 \cdot 10^3$ to $3 \cdot 10^4$ per g of fat.

Mutagenic activity of these used deep-frying fat samples was found to correlate positively with concentrations of lipid oxidation products as determined by the colorimetric thiobarbituric acid assay, and with concentrations of linoleic acid hydroperoxides. The absence of an association between mutagenicity of repeatedly used deep-frying fats and levels of di- and polymeric triglycerides or polar material, which are chemical

parameters used in the quality control of deep-frying fats, indicated that quality control as currently applied does not determine compounds associated with genotoxic risk, and may therefore be considered inadequate. It has been shown that repeatedly used deep-frying fats do possess mutagenic activity in the *Salmonella*/microsome assay, which may be related to autoxidation of polyunsaturated fatty acids.

In a series of frying experiments, mutagen formation during deep-fat frying was investigated using various types of deep-frying fats. It was observed that frying of various foods, including proteinaceous products, appeared to enhance mutagen formation as compared to use of the fat for preparation of fried potatoes exclusively. In spite of substantial oxidative deterioration and lipid oxidation occurring in some used fats, it was found that after application of heating temperatures of maximally 180 °C and limiting heating time of fats to 30 hours, mutagenicity to strain TA97 of these fats amounted to $1\text{--}3 \cdot 10^3$ revertants per g of fat, which was moderate as compared to the previously tested "abused" samples. The results of these frying experiments did not support the existence of a causal relation between lipid oxidation or oxidative deterioration, and mutagenicity of heated deep-frying fats. It was therefore concluded that other compounds are also involved in mutagen formation during deep-fat frying. These remain to be determined but are most likely to be related to the nature of the foods prepared and to the frying procedures employed.

Subsequently, *in vitro* genotoxicity to human lymphocytes was tested of three heated deep-frying fats showing moderate mutagenic activity to *Salmonella* strain TA97, inducing $2\text{--}3 \cdot 10^3$ revertants per g of fat. Dose-related statistically significantly increased frequencies of sister chromatid exchanges were induced by one of the used deep-frying fats tested; the absolute increase observed however, was small indicating a relatively weak potency. Another fat increased mutation frequencies of 6-thioguanine-resistant T-lymphocytes in a first series of tests, but since this effect could not be duplicated after retesting, it was therefore suggested that instable compounds might be involved. Heated fats were found to increase cell proliferation of phytohaemagglutinin stimulated human T-lymphocytes. Neither concentrations of lipid oxidation products, nor oxidative deterioration of heated deep-frying fats appeared to be associated with genotoxicity and stimulation of cell growth of PHA-stimulated human lymphocytes. These data indicate that heated deep-frying fats may possess genotoxic properties to human lymphocytes. Since no evidence has been found for a causal role of autoxidation products of lipids, the nature of the active compounds remains to be established.

Consumption by human volunteers of fried potatoes prepared in deep-frying fats, showing mutagenicity to *Salmonella* strain TA97, was not found

to increase urinary nor faecal mutagen excretion to this strain, although lipid fractions isolated from deep-fat fried potatoes also showed mutagenic activity and the mutagenic load consumed with fried potatoes amounted approximately to $2.3 \cdot 10^5$ revertants. These data indicated that mutagenic compounds present in the heated deep-frying fats, are not likely to affect the colon. No other adverse effects were observed in human volunteers after daily consumption of a portion of fried potatoes prepared in mutagenic deep-frying fat.

In rats, consumption of heated mutagenic coconut oil or polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich deep-frying oil did not increase urinary and faecal mutagen excretion to Salmonella strain TA97 either. The heated PUFA-rich frying oil which showed mutagenic activity to strain TA100 however, was found to increase rat urinary mutagenicity to strain TA100. No effect was observed on rat faecal mutagen excretion to this strain. Urinary recovery of the dose consumed was <1%, suggesting that after absorption mutagenic compounds were inactivated *in vivo*, or retained in the tissues. In addition, consumption of heated PUFA-rich frying oil increased urinary excretion of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) in rats. Excretion in urine and faeces was found to be 4% and 3% of the ingested dose respectively, indicating most TBA-RS present in this heated PUFA-rich frying oil were bioavailable. Short-term feeding of this PUFA-rich frying oil to rats also increased plasma activities of glutamic pyruvic transaminase and alkaline phosphatase as compared to feeding of unheated frying oil or heated coconut oil, which may indicate adverse effects on liver and kidneys.

After short-term feeding of heated PUFA-rich frying oil cell proliferation in the upper gastro intestinal tissues of rats was slightly, but statistically significantly enhanced as compared to feeding of unheated oil or heated coconut oil, indicating that heated PUFA-rich frying oil contained compounds that stimulate cell growth *in vivo*. This cell proliferation enhancing activity is considered to indicate tumor-promoting effects, but this may also reflect initiating properties since increased cell proliferation has been reported to be an early effect in tumorigenesis. No enhanced cell proliferation was found in the colon of rats fed PUFA-rich heat-processed fat, implicating the enhancing effects were limited to the upper gastro-intestinal tract. The degrees of oxidative deterioration and mutagenicity of heated frying oils fed to the rats however, were moderate as compared to levels of lipid oxidation products found in commercially used deep-frying fat samples. Effects of consumption of high levels of specific oxidation products remain to be determined. Therefore, it can not be excluded that consumption of heated oils containing higher doses of lipid oxidation and mutagens may exert effects in the lower part of the gastro intestinal tract.

Finally, it is concluded that an involvement of heat-processed lipids in

colon tumorigenesis is not supported by the data presented in this thesis, since consumption of mutagenic deep-frying fats did not increase faecal mutagenicity in both rats and humans, and was not found to affect colonic cell proliferation in rats. Heated deep-frying fats however, have been found to show genotoxic properties to human lymphocytes, causing some concern with respect to human genotoxic risk. Elucidation of the nature of active compounds present in heated deep-frying fats, as well as determination of their concentration in deep-fat fried and other lipid-containing heat-processed foods is indicated before further testing of genotoxic, carcinogenic or tumor-enhancing activities is applied to evaluate health risk to man.

Samenvatting

Een hoge consumptie van vet en vleesprodukten, hetgeen kenmerkend is voor het "Westerse" voedingspatroon, is in epidemiologische onderzoeken herhaaldelijk in verband gebracht met een verhoogd risico voor colonkanker. Hoewel hiervoor verscheidene mechanistische verklaringen zijn gepostuleerd, hebben noch epidemiologische, noch experimentele onderzoeken consistente resultaten opgeleverd, die een causaal verband tussen een hoge vet inneming en het ontstaan van colonkanker ondersteunen. Deze tegenstrijdige onderzoeksresultaten kunnen onder meer worden toegeschreven aan het feit dat epidemiologische onderzoeken geen onderscheid maken tussen verhitte en onverhitte vetten in de voeding. In de inleiding van dit proefschrift is beschreven dat tijdens het verhitten van voedingsvetten oxydatie- en thermale degradatieprodukten ontstaan, die mogelijk tumor-initiërende of -bevorderende eigenschappen hebben. Experimentele onderzoeken naar de rol van voedingsvet in het ontstaan en ontwikkelen van colonkanker bestuderen hebben tot nu toe evenmin aandacht besteed aan een mogelijke rol voor componenten die aanwezig kunnen zijn in verhitte voedingsvetten. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift had daarom tot doel de mogelijke rol van verhitte voedingsvetten in colonicarcinogenese te verkennen; hiertoe zijn verhitte voedingsvetten onderzocht op genotoxische en andere nadelige biologische effecten in het colon. Hierbij is gekozen voor herhaaldelijk gebruikte frituurvetten, omdat deze vetten langdurig verhit worden en zeer vatbaar zijn voor oxydatie tijdens het frituren van voedingsmiddelen.

In eerste instantie zijn herhaaldelijk gebruikte frituurvetmonsters getest op mutageniteit in de Salmonella mutageniteitstest om mogelijke tumor-initiërende activiteiten te bepalen. Deze frituurvetmonsters waren verzameld door de Maastrichtse Rijkskeuringsdienst van Waren op basis van sensorische indicatie van ondeugdelijkheid. Zeventien van de twintig geteste frituurvetmonsters vertoonden mutagene activiteit in Salmonella stammen TA97, TA100 of TA104. De hoogste mutagene activiteit werd aangetroffen in de polaire fraktie van het vet. Deze was geïsoleerd met behulp van silicagel kolomchromatografie en bevat voornamelijk polaire oxydatie- en degradatieprodukten. De mutagene activiteit van deze polaire frakties was het hoogst in Salmonella stam TA97, en was in het algemeen gereduceerd wanneer de frakties getest werden in aanwezigheid van rattelever S9 mix. Het aantal revertanten dat geïnduceerd werd door herhaaldelijk gebruikt frituurvet varieerde van $1 \cdot 10^3$ tot $3 \cdot 10^4$ per g vet.

De mutageniteit van deze frituurvetmonsters was positief geassocieerd met de colorimetrisch bepaalde gehalten aan lipid peroxydatieprodukten, en in mindere mate met de met behulp van HPLC gemeten concentratie linolzuur-hydroperoxyden. Er werden geen significante associaties gevonden tussen mutageniteit en gehalten aan di- en polymere triglyceriden of de hoeveelheid polair materiaal, hoewel dit chemische parameters zijn die worden gehanteerd bij de kwaliteitsbepaling van gebruikt friuurvet. Het ontbreken van een associatie tussen chemische kwaliteitsparameters en mutageniteit betekent dat deze parameters geen aanwijzing geven omtrent een eventueel genotoxisch risico, en impliceert dat verbetering van de kwaliteitscontrole gewenst is. Op grond van de gevonden resultaten wordt geconcludeerd dat herhaaldelijk gebruikte frituurvetten componenten kunnen bevatten die mutageen zijn voor *Salmonella typhimurium*. De mutageniteit blijkt geassocieerd met de aanwezigheid van auto-oxydatieprodukten van meervoudig onverzadigde vetzuren.

In een serie frituuronderzoeken is vervolgens de vorming van mutagene componenten tijdens het frituren onderzocht. De bereiding van verschillende produkten, waaronder eiwitrijke produkten bleek aanleiding te geven tot een hogere produktie van mutagenen dan het frituren van uitsluitend patat frites. Hoewel in sommige van deze herhaaldelijk gebruikte vetten aanzienlijke oxydatie optrad na verhitten bij een temperatuur van maximaal 180 °C gedurende 30 uur, bereikte de mutageniteit in stam TA97 waarden variërend van 1 tot $3 \cdot 10^3$ revertanten per gram vet, wat in vergelijking met de eerder geteste "ondeugdelijke" monsters een relatief geringe mutageniteit genoemd kan worden. De resultaten van deze serie frituurexperimenten leverden geen aanwijzing op voor een causaal verband tussen lipid peroxydatie of oxydatieve degradatie, en mutageniteit van verhitte frituurvetten. Hieruit wordt geconcludeerd dat andere componenten eveneens een rol spelen bij de produktie van mutagenen tijdens het frituren. De aard van deze verbindingen dient nog nader bepaald te worden, maar gesteld wordt dat de vorming van deze componenten onder meer afhankelijk is van de aard en kwaliteit van de frituurvetten en de daarin bereide voedingsmiddelen, en van de omstandigheden waaronder wordt gefrituurd.

Drie verhitte frituurvetten, waarvoor in de Ames-test (stam TA97) een mutagene aktiviteit gevonden was van 2 tot $3 \cdot 10^3$ revertanten per gram vet, werden met behulp van humane lymfocyten verder onderzocht op genotoxiciteit. Een dosis-afhankelijke statistisch significante toename in zuster chromatide uitwisselingen (sister chromatid exchanges, SCE's) werd geïnduceerd door één van de geteste gebruikte frituurvetten. De absolute toename was echter gering, wat duidt op een relatief lage genotoxische potentie. Een tweede vet veroorzaakte in een eerste serie van testen een verhoogde frequentie van 6-thioguanine-resistente T-lymfocyten. Echter, na

hertesten van hetzelfde vetmonster werd geen verhoogde frequentie van mutante T-lymfocyten waargenomen, hetgeen mogelijk wijst op de aanwezigheid van onstabiele mutagenen. Verhitte vetten bleken *in vitro* de celproliferatie van met phytohaemagglutinine-gestimuleerde humane T-lymfocyten te bevorderen. Dit effect was noch geassocieerd met de concentratie van lipid oxydatieprodukten, noch met de mate van oxydatieve degradatie. Verhitte friuurvetten blijken dus componenten te kunnen bevatten die genotoxisch zijn voor humane lymfocyten. Er is echter geen duidelijke aanwijzing gevonden voor een causale relatie tussen genotoxiciteit en de aanwezigheid van specifieke oxydatieprodukten van vetzuren.

Consumptie van patates frites gebakken in frituurvet dat mutagene activiteit in stam TA97 vertoonde, leidde niet tot verhoogde uitscheiding van mutagenen in urine en faeces van humane vrijwilligers, hoewel in de vetfrakties die waren geïsoleerd uit patates frites mutagene activiteit was gevonden en de inneming van mutagenen was berekend op 2 tot $3 \cdot 10^5$ revertanten. Dit impliceert dat de mutagene componenten in het verhitte frituurvet en de patat frites in het colon geen detecteerbare verhoogde mutagene activiteit veroorzaken. Evenmin werden andere nadelige gezondheidseffecten gevonden in humane vrijwilligers na dagelijkse consumptie van een portie in mutageen frituurvet bereide patates frites.

In ratten bleek dagelijkse consumptie van verhitte, mutagene cocosnoot olie, noch van verhit mutageen meervoudig onverzadigde vetzuren (MOV)-rijk frituurvet in een verhoogde uitscheiding van TA97-mutagenen in urine en faeces te resulteren. In de groep ratten die verhit MOV-rijk frituurvet consumeerde werd een verhoogde uitscheiding van TA100-mutagenen in de urine gevonden. De uitscheiding van TA100-mutagenen in de faeces was niet verhoogd in deze groep. Van de geconsumeerde dosis TA100-mutagenen werd in de urine minder dan 1% teruggevonden, wat erop wijst dat deze mutagene componenten na absorptie worden geïnactiveerd *in vivo*, of dat deze componenten achterblijven in de weefsels. De groep ratten die verhit MOV-rijk frituurvet consumeerde had eveneens een verhoogde urinaire uitscheiding van thiobarbituurzuur-reaktieve verbindingen (thiobarbituric acid-reactive substances; TBA-RS). De uitscheiding van TBA-RS in urine en faeces in deze groep was respectievelijk 4 en 3% van de ingenomen dosis, wat erop duidt dat de meeste TBA-RS biologisch beschikbaar zijn. In de groep ratten die verhit MOV-rijk frituurvet consumeerde werden een verhoogde activiteit van serum glutamic pyruvatic transaminase (SGPT) en alkalische fosfatase gevonden in vergelijking met de groepen die het onverhitte MOV-rijke frituurvet of de verhitte cocosnoot olie consumeerden, wat een aanwijzing is voor mogelijke celbeschadiging in lever en nieren.

Consumptie van verhit MOV-rijk frituurvet bleek de celproliferatie in slokdarm en voormag van ratten licht te verhogen in vergelijking met consumptie van onverhitte vetten of verhitte cocosnoot olie. Het verhitte MOV-rijke frituurvet bevatte blijkbaar verbindingen die *in vivo* de celproliferatie stimuleren. Een stimulatie van de celgroei wordt in het algemeen beschouwd als een tumorbevorderend effect, maar een verhoogde celproliferatie kan ook optreden als gevolg van bepaalde tumor-initiërende activiteiten. Er werd geen stimulatie van de celproliferatie in het colon gevonden na consumptie van verhit MOV-rijk frituurvet en het stimulerende effect op de celproliferatie beperkte zich tot het voorste deel van het maag-darm kanaal. De mate van oxydatieve degradatie en de mutageniteit van de verhitte frituurvetten die door de ratten werden geconsumeerd was relatief laag in vergelijking met gehalten aan lipid oxydatieproducten die waren gevonden in een aantal commerciële gebruikte "ondeugdelijke" frituurvetten. Niet bekend is of consumptie van verhitte vetten met hoge gehalten aan lipid oxydatieproducten wel leidt tot nadelige effecten in het colon; hiervoor is nader onderzoek vereist.

Tenslotte wordt op basis van de resultaten beschreven in dit proefschrift geconcludeerd dat voor verhitte vetten geen rol van betekenis in colon-carcinogenese lijkt weggelegd. Consumptie van mutageen frituurvet bleek noch in de mens, noch in de rat aanleiding te geven tot een verhoogde faecale mutageniteit, en bleek in ratten de celproliferatie in het colon niet te stimuleren. Verhitte frituurvetten vertoonden echter wel genotoxische activiteit in humane lymfocyten *in vitro*, wat een mogelijk genotoxisch risico voor de mens impliceert. Voor een evaluatie van het gezondheidsrisico voor de mens is daarom eerst opheldering vereist van de aard van deze actieve componenten, alsmede een bepaling van de gehalten hiervan in gefrituurde en andere vetrijke verhitte voedingsmiddelen. Vervolgens kan worden overgegaan tot een nadere analyse van specifieke genotoxische, carcinogene of tumorbevorderende eigenschappen van deze verbindingen.